

**Liposome-encapsulated taxol, its preparation and its use**

Patent Number: ☐ US6090955  
Publication date: 2000-07-18  
Inventor(s): BRANDL MARTIN (DE); RESZKA REGINE (DE); WARNKE GERNOT (DE);  
FICHTNER IDUNA (DE)  
Applicant(s): MAX DELBRUECK CENTRUM (DE)  
Requested Patent: ☐ DE4430593 ✓  
Application  
Number: US19970793238 19970619  
Priority Number  
(s): DE19944430593 19940820; WO1995DE01163 19950818  
IPC Classification: C07D493/00  
EC Classification: A61K9/00M20B, A61K9/127P, A61K31/335L, A61K31/555  
Equivalents: ☐ EP0776202 (WO9605821), B1, B1, ☐ WO9605821

**Abstract**

PCT No. PCT/DE95/01163 Sec. 371 Date Jun. 19, 1997 Sec. 102(e) Date Jun. 19, 1997 PCT Filed Aug. 18, 1995 PCT Pub. No. WO96/05821 PCT Pub. Date Feb. 29, 1996 The aim of the invention is to produce liposome-encapsulated taxol with a high taxol concentration and high stability and hence a high therapeutic effect. The invention involves the development of specific forms of taxol encapsulation and the use of these, optionally in combination with other substances, in the treatment of various types of tumor. The liposome-encapsulated taxol is characterized in that it is prepared by high-pressure homogenization or by aerosol formulation.

Data supplied from the esp@cenet database - I2

AG



①9 BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENTAMT

⑫ **Offenlegungsschrift**  
⑩ **DE 44 30 593 A 1**

⑤1 Int. Cl. 6:  
**A 61 K 31/335**  
A 61 K 9/127

②1 Aktenzeichen: P 44 30 593.1  
②2 Anmeldetag: 20. 8. 94  
④3 Offenlegungstag: 22. 2. 96

DE 44 30 593 A 1

⑦1 Anmelder:  
Max-Delbrück-Centrum für molekulare Medizin,  
13125 Berlin, DE

⑦2 Erfinder:  
Reszka, Regine, Dr., 16341 Schwanebeck, DE;  
Brandl, Martin, Dr., 79102 Freiburg, DE; Fichtner,  
Iduna, Dr., 13125 Berlin, DE; Warnke, Gernot, Dr.,  
79102 Freiburg, DE

AG

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

⑤4 Liposomal verkapseltes Taxol, seine Herstellung und seine Verwendung

⑤7 Anwendungsgebiete der Erfindung sind die Medizin und die pharmazeutische Industrie.  
Die Erfindung hat das Ziel, liposomal verkapseltes Taxol mit hohem Taxolanteil und höherer Stabilität, damit erhöhter therapeutischer Wirksamkeit, zur Verfügung zu stellen. Die Aufgabe besteht darin, spezifische Formen der Verkapselung von Taxol zu entwickeln und diese, ggf. in Kombination mit anderen Substanzen, zur Behandlung unterschiedlicher Tumorarten einzusetzen.  
Das liposomal verkapselte Taxol ist dadurch gekennzeichnet, daß es durch Hochdruckhomogenisierung bzw. durch Aerosolbildung erzeugt wurde. Ein Beispiel ist die Anwendung in Kombination mit liposomal verkapseltem Carboplatin in Aerosolform gegen Lungenmetastasen.

DE 44 30 593 A 1

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

BUNDESDRUCKEREI 12. 95 508 068/420

1/30

## Beschreibung

Die Erfindung betrifft liposomal verkapseltes Taxol, seine Herstellung und seine Verwendung. Anwendungsgebiete der Erfindung sind die Medizin und die pharmazeutische Industrie.

Taxol ist ein in der Rinde verschiedener Eibenarten (Taxaceen) vorkommender Naturstoff, der aus diesen Rinden [J. Amer. Chem. Soc. 93 : 2325 (1971)] bzw. neuerdings auch durch chemische Synthese [J. Amer. Chem. Soc., 1110 : 5917—5919 (1988)] gewonnen werden kann. Taxol verfügt im Vergleich zu bisher bekannten Zytostatika über einen völlig neuartigen Wirkmechanismus [Ann. NY. Acad. Sci. 466 : 733—744 (1986); Sartorelli, A. (ed.): Molecular Actions and Targets for Cancer Chemotherapeutic Agents. Academic Press, New York, 1981, pp. 483—507.] Die Substanz fördert die Aggregation der Mikrotubuli aus Tubulindimeren und stabilisiert die Mikrotubuli durch Hemmung ihrer Depolymerisation. Weiterhin kommt es zu einer abnormen Anordnung und Bündelung von Mikrotubuli während des gesamten Zellzyklus, was zur Bildung multipler mikrotubulärer Teilungssterne während der Mitose und damit zur Hemmung der normalen dynamischen Reorganisation des mikrotubulären Netzwerkes führt. Da dadurch die vitale Zellfunktion in der Interphase und während der Mitose entscheidend beeinflusst wird, zeigt Taxol eine deutliche antineoplastische Aktivität gegen verschiedene Tumoren, u. a. gegen implantierte B16-Melanome, P388-Leukämie und gegen humane Mammatumoren.

Die Anwendbarkeit von Taxol ist durch seine geringe Wasserlöslichkeit stark eingeschränkt. Lösungsvermittler wie Cremophor (polyethoxyliertes Castoröl) und Alkohol verbessern die Löslichkeit, führen jedoch bei der Anwendung zu erheblichen Nebenwirkungen, z. B. zu anaphylaktoiden Reaktionen. Die Verdünnung solcher Lösungen mit physiologischer Kochsalzlösung zur Applikation hat den Nachteil, daß Taxol in physiologischer Kochsalzlösung keine ausreichende Stabilität (maximal 24 Stunden) besitzt. Eine dosislimitierende Nebenwirkung ist die Myelosuppression in erster Linie die Neutropenie [Semin. Oncol. 19 : 646-662 (1992)]. Liposomen bieten aufgrund ihres amphiphilen Charakters die Möglichkeit sowohl wasser- als auch lipidlösliche Substanzen einzuschließen bzw. zu inkorporieren.

Taxol als eine fast wasserunlösliche Substanz läßt sich mit hoher Effizienz in der Lipidphase von Liposomen geeigneter Zusammensetzung lösen, so daß die durch Cremophor EL beim Menschen beobachteten Toxizitäten einschließlich einer vermehrten Chylomikronenbildung nicht mehr auftreten sollte. Die therapeutische Effektivität von freiem, liposomal verkapseltem und nanopartikulärem Taxol werden an zwei Leukämien, der P388 und der L1210, in vitro verglichen. Während die Wachstumshemmung der P388-Zellen für alle 3 Arzneimittelformen gleich war, zeigte die L1210 eine größere Sensitivität gegenüber der nanopartikulären Form. Bei Testung aller 3 Zubereitungen an der P388 in vivo (12,5 mg/kg/4 Tage) waren die freie und liposomale Form in ihrer therapeutischen Effektivität vergleichbar, während nanopartikuläres Taxol akute Toxizitäten hervorrief [J. Microencapsul. 7 (2): 191-7 (1990)]. In einer weiteren Studie wurde Taxol in freier und liposomaler Form hinsichtlich der Antitumoraktivität an zwei humanen Glioblastomen im Nude-Modell getestet (12,5 mg/kg/4 Tage). Beide Formen führten zu einer signifikanten Verringerung des Tumorwachstums [In-Vivo 6 (1):23-7 (1992)]. Sharma et al. [Cancer Res. 53 : 5877-81(1993)] und Straubinger et al. [J. Natl. Cancer Inst. Monographs 15 : 69—78 (1993)] berichten von einem signifikanten Antitumoreffekt von liposomalem Taxol (10—45 mg/kg) am murinen Taxol-resistenten Colon-26-Modell. In WO 93/18751 wird die Verkapselung von Taxol in Liposomen und die Verwendung der erhaltenen Produkte zur Behandlung von Krebserkrankungen beschrieben. Bevorzugt wird eine Kombination dieser Behandlung mit Hyperthermie. Die hergestellten Taxol-Liposomen zeigen eine verbesserte Stabilität.

Bisher wurde ein Patent (WO 93/18751) angemeldet, in dem eine Vielzahl von Taxol-Liposomen-Kombinationen beansprucht wird, von denen insbesondere Vesikel mit positiver Ladung auf der Basis von Cardiolipin, Phosphatidylcholin und Cholesterol hergestellt und untersucht wurden.

Das auf diese Weise verkapselte Taxol mußte jedoch in den Tierversuchen an vier aufeinanderfolgenden Tagen appliziert werden, da eine einmalige Gabe offensichtlich nicht zum gewünschten Antitumoreffekt führte.

Die Erfindung hat das Ziel, liposomal verkapseltes Taxol mit hohem Taxolanteil und höherer Stabilität, damit erhöhter therapeutischer Wirksamkeit, zur Verfügung zu stellen. Die Aufgabe besteht darin, spezifische Formen der Verkapselung von Taxol zu entwickeln und diese, ggf. in Kombination mit anderen freien bzw. liposomal verkapselten Substanzen, zur Behandlung unterschiedlicher Tumorarten und Lokalisationen einzusetzen. Im Vordergrund steht hierbei neben der möglichst einmaligen Applikation des liposomalen Taxols auch die Verhinderung des dosislimitierenden neutropenischen Effektes, des unverkapselten Taxols z. B. durch Kombination mit liposomalem Carboplatin.

Die Aufgabe wird gemäß den Ansprüchen 1, 13, 14 und 16 gelöst, die Unteransprüche sind Vorzugsvarianten. Die Verkapselung wird erfindungsgemäß mittels Hochdruckhomogenisierung bzw. mittels Aerosolbildung durchgeführt.

Unsere eigenen Experimente umfassen Arbeiten zur Präparation und Charakterisierung verschiedener taxolhaltiger Liposomentypen unterschiedlicher Größe und Zusammensetzung (vgl. Ansprüche).

Für die tierexperimentelle Prüfung wurden Liposomen nach Beispiel 1 eingesetzt. Es konnte u. a. an einem menschlichen Mamma-Karzinom (MaTu) gezeigt werden, daß diese Liposomenpräparation im Vergleich zum freien Taxol (4 Tage Therapie, je Tag 12,5 mg/kg) bereits nach einmaliger Applikation von 50 mg/kg eine verbesserte therapeutische Wirksamkeit bei geringerer Hämatotoxizität aufwies (Abb. 1 + 2).

Als Verkapselungsmittel werden verwendet

- a) ein natürliches, halbsynthetisches oder vollsynthetisches Amphiphil, wie ein Lipid, ein Tensid oder einen Emulgator,
- b) eine geladene Lipidkomponente und/oder eine gesättigte Lipidkomponente,

eine Etherlipidkomponente,

c) ein Polymer

d) eine Trägerflüssigkeit und ggf. zusätzliche Hilfsstoffe, wie z. B. Nanopartikel enthält.

Das Amphiphil hat bevorzugt die in Anspruch 3 angegebene Formel I. Als geladene Lipidkomponente werden bevorzugt eingesetzt: das Anion des Dicethylphosphats, der Palmitinsäure, der Stearinsäure, das Anion eines Phospholipids, wie Phosphatidylserin oder Phosphatidsäure oder das Anion eines Sphingolipids wie Sulfatid. In einer besonders günstigen Ausführungsform der Erfindung wird als geladene Lipidkomponente Phosphatidylglycerol eingesetzt.

Die Erfindung kann gleichermaßen mit neutralen Lipidkomponenten wie Phosphatidylcholin oder gesättigten Lipidkomponenten wie Dipalmitoylphosphatidylcholin realisiert werden. Als Polymer dient z. B. Polyethylenglycol vom Molekulargewicht 2000—10 000. Als Trägerflüssigkeit wird im allgemeinen physiologische Kochsalzlösung eingesetzt. Gegenstand der Erfindung ist auch eine pharmazeutische Zubereitung, die das erfindungsgemäße liposomal verkapselte Taxol und pharmazeutisch übliche Träger- und Zusatzstoffe enthält. Eine praktisch vorteilhaft einsetzbare Mischung enthält 0,98 mg Taxol in 50 mg Phosphatidylcholin (98% der eingesetzten Taxolmenge).

Die liposomale Verkapselung erfolgt durch Hochdruckhomogenisierung oder durch spontane Vesikelbildung. Im ersten Falle wird eine vorgefertigte Liposomen-Mischung in fester bzw. flüssiger Form mit Taxol vereinigt, nachfolgend mehrfach (bevorzugt 2 fach) bei 5—160 MPa homogenisiert und ggf. nachfolgend lyophilisiert.

Das Herstellungsverfahren zur Erzeugung Taxol-haltigen liposomalen Zubereitung mittels Hochdruckhomogenisation, sowie ggf. Freisetzung von Liposomen aus einer solchen Zubereitung umfaßt folgende Schritte:

1) Fakultativ Herstellung eines Lipidfilms und Überführung desselben in eine Vormischung bestehend aus Membranbildnern und wäßrigem Medium:

Herstellung eines dünnen, trockenen Lipidfilms durch Auflösen des Taxols zusammen mit den Membranbildnern in organischen Lösungsmitteln. Nachfolgend vollständige Entfernung der Lösungsmittel durch Evaporation ggf. durch Sprühtrocknung. Dispergieren des Lipidfilms nach Zugabe von wäßrigem Medium, z. B. durch Schütteln, Rühren, Kneten o. ä. ggf. unter erhöhter Temperatur (ca. 10° C oberhalb der Phasenübergangstemperatur der Phospholipide).

2) Hochdruckhomogenisation:

Entweder die aus 1) erhaltene Vormischung oder alternativ ein Gemisch aus Lipid(en), Wasser und Taxol (ggf. grob dispergiert durch Rühren z. B. mittels eines Magnetrührers o. ä.) wird ein- oder mehrmals (jedoch nicht mehr als fünfzigmal) der Hochdruckhomogenisation (z. B. mittels APV Gaulin Micron Lab) unter Drucken zwischen 5 und 160 Mpa (50 bis 1600 bar) unterzogen. Edukt, Homogenisator und Produkt werden ggf. temperiert.

3) Fakultativ Gefrier/Tau-Behandlung:

Durch ein- bis mehrmaliges Einfrieren und nachfolgendes Wiederauftauen der Zubereitung während, d. h. zwischen einzelnen Zyklen der Hochdruckhomogenisation oder an deren Ende wird eine homogenere Durchmischung des Ansatzes erreicht und evtl. die vorgebildeten Liposomen vorübergehend destabilisiert, so daß Liposomen mit noch mehr inkorporierten Taxol gebildet werden.

4) Fakultativ Gefriertrocknen und Redispergieren:

Durch ein- bis mehrmaliges Gefriertrocknen und nachfolgendes Redispergieren der Zubereitungen bevorzugt während, d. h. zwischen einzelnen Zyklen der Hochdruckhomogenisation oder an deren Ende wird eine homogenere Durchmischung des Ansatzes erreicht und die vorgebildeten Liposomen vorübergehend destabilisiert, so daß Liposomen mit noch mehr inkorporiertem Taxol gebildet werden.

5) Fakultativ Überführung der Zubereitung in eine freifließende Liposomendispersion:

Durch schrittweise Zugabe von wäßrigem Medium in Volumenanteilen von 1 bis 30% des Volumens der Zubereitung und mechanisches Mischen z. B. durch manuelles Schütteln oder mittels eines Vortex Mixers wird das dreidimensionale Gelgerüst zerlegt und die vorgebildeten Liposomen freigesetzt.

6) Fakultativ Filtration der Liposomendispersion:

Falls die Liposomengröße nach oben hin begrenzt werden soll bzw. eine sterile Zubereitung erhalten werden soll, kann die Liposomendispersion durch Filter mit einer Porenweite von 0,1 µm bis 1 µm filtriert werden.

Die erfindungsgemäße Zubereitung, die Liposomen in dichter Packung enthält (Liposomengel), eignet sich als Wirkstoffdepot, das den Wirkstoff langsam freisetzt und zwar entweder in gelöster Form oder in Form einzelner Wirkstoff-enthaltender Liposomen. Diese Zubereitung kann durch Injektion (z. B. i.m., i.p.) oder Implantation angewendet werden. Aber auch ein Einbringen in Körperhöhlen oder ein Aufbringen auf Schleimhäute, auf die Hornhaut des Auges (Kornea) oder Hautpartien ist möglich. Somit dient die Zubereitung als Träger des Wirkstoffs sowie ggf. zu dessen modifizierter Freigabe.

Die erfindungsgemäße Zubereitung, die Liposomen in freifließender Form enthält, eignet sich als Träger des Wirkstoffs. Diese Zubereitung kann durch Injektion (z. B. i.v., i.m.) oder ebenfalls durch Einbringen in Körperhöhlen oder Aufbringen auf Schleimhäute, auf die Hornhaut des Auges (Kornea) oder Hautpartien angewendet werden. Die erfindungsgemäß verkapselten Liposomen führen zu einer Verteilung des liposomalen Wirkstoffs im Körper, die selektiv eine hohe und lange andauernde Wirkstoffkonzentration am Wirkort bewirkt und damit zu einer Verbesserung der Wirkung oder zu einer Verbesserung des Verhältnisses von Wirkung zu Nebenwirkung.

Zur spontanen Vesikelbildung wird die Taxol/Verkapselungsmittel/Treibgas-Mischung aus Dosieraerosolen

versprüht und bildet nach dem Verdampfen des Treibgases auf der Lungenoberfläche spontan liposomal verkapseltes Taxol. Alternativ können vorgebildete Taxol-Liposomen vernebelt werden.

Dieser Weg ist vor allem dann vorzuziehen, wenn ein direkter Einsatz gegen Lungenmetastasen beabsichtigt ist.

Das liposomal verkapselte Taxol ist als Zytostatikum verwendbar. Diese Verwendung kann allein oder in Kombination mit anderen Wirkstoffen wie Carboplatin oder liposomal verkapseltem Carboplatin erfolgen. Bevorzugt ist der Einsatz gegen Hirntumoren, maligne Melanome, Lebermetastasen, Lungenmetastasen, Mammakarzinome und gegen Urogenitalkarzinome.

Bei der Behandlung u. a. eines menschlichen Mamma-Karzinomen auf der Nudemaus wurde nach einmaliger Gabe von 50 mg/kg liposomal verkapseltem Taxols, im Vergleich zur behandelten Taxolgruppe ( $4 \times 12,5$  mg/kg) eine signifikante Tumolvolumenhemmung erreicht.

Die Erfindung soll nachfolgend durch Ausführungsbeispiele näher erläutert werden.

#### Beispiel 1

Ein Lipidfilm, bestehend aus 1500 mg Eiposphatidylcholin und 30 mg Taxol wird in 30 ml steriler, Calciumfreier Phosphat-gepufferter (pH 7,2–7,4) Kochsalzlösung dispergiert. Die entstandene Dispersion multischichtiger Liposomen wird im Hochdruckhomogenisator (Gaulin Mikrolab 40) bei 700 bar behandelt. Die entstandene Liposomendispersion (SUV) ist bei 4 Grad Celsius kurzzeitig lagerfähig und eignet sich zur parenteralen (i.v.) Applikation. Zur längeren Lagerung eignet sich die Gelbildung bzw. die Lyophilisierung.

#### Beispiel 2

Liposomen, hergestellt wie im Beispiel 1 werden mit einem geeigneten Vernebler aerosolisiert (z. B. Aero-Tech II) und somit der inhalativen Applikation zugänglich gemacht.

#### Beispiel 3

200 mg Taxol, 200 mg Verkapselungsmittel nach Anspruch 2 und 400 µl Ethanol (90%) werden in einen Druckgasbehälter dosiert. Nach Aufbördeln eines Dosierventils (z. B. Perfect Valois DF 10/150 ACT) wird die Zubereitung mit 10 ml druckverflüssigtem Dimethylether versetzt, so daß die klare bis opaleszierende oder leicht getrübbte Lösung entsteht.

#### Beispiel 4

Wie Beispiel 3, jedoch unter Verwendung von druckverflüssigtem Isobutan als Treibgas.

#### Beispiel 5

Wie Beispiel 3, jedoch unter Verwendung von druckverflüssigtem Propan/Butan (15/85) als Treibgas.

#### Patentansprüche

1. Liposomal verkapseltes Taxol, dadurch gekennzeichnet, daß es durch Hochdruckhomogenisierung bzw. durch Aerosolbildung erzeugt wurde.

2. Liposomal verkapseltes Taxol nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß es als Verkapselungsmittel a) ein natürliches, halbsynthetisches oder vollsynthetisches Amphiphil, wie ein Lipid, ein Tensid oder einen Emulgator,

b) eine geladene Lipidkomponente und/oder

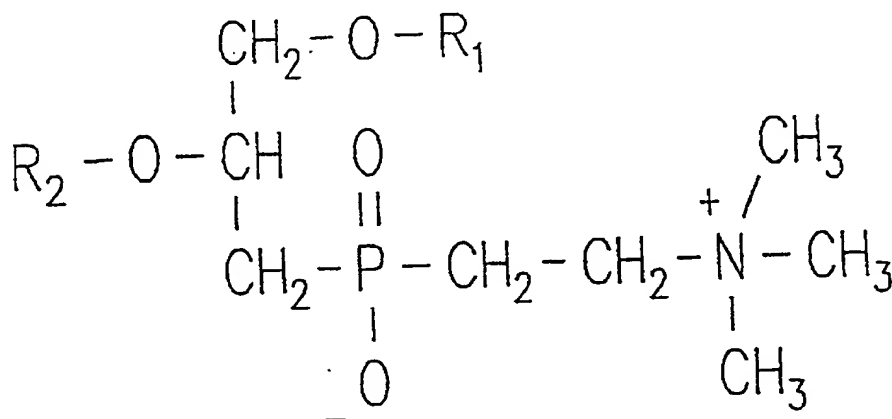
eine gesättigte Lipidkomponente und/oder

eine Etherlipidkomponente,

c) ein Polymer

d) eine Trägerflüssigkeit und ggf. zusätzliche Hilfsstoffe, wie z. B. Nanopartikel enthält.

3. Liposomal verkapseltes Taxol nach Anspruch 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, daß es ein natürliches, halbsynthetisches oder vollsynthetisches Amphiphil der allgemeinen Formel I,



- worin  $\text{R}_1$  und  $\text{R}_2$   $\text{C}_{10}$ – $\text{C}_{20}$ -Alkanoyl-, -Alkenoyl-, -Alkyl-, -Alkenyl bedeuten, enthält.
4. Liposomal verkapseltes Taxol nach Anspruch 1–3, dadurch gekennzeichnet, daß es als geladene Lipidkomponente das Anion des Dicethylphosphats, der Palmitinsäure, der Stearinsäure, das Anion eines Phospholipids, wie Phosphatidylserin, Phosphatidsäure, oder das Anion eines Sphingolipids, wie Sulfatid enthält.
  5. Liposomal verkapseltes Taxol nach Anspruch 1–4, dadurch gekennzeichnet, daß es als geladene Lipidkomponente ein chemisch modifiziertes Phosphatidylethanolamin enthält über das Proteine (wie z. B. Antikörper) angekoppelt werden können.
  6. Liposomal verkapseltes Taxol nach Anspruch 1–5, dadurch gekennzeichnet, daß es als neutrale Lipidkomponente Phosphatidylcholin enthält.
  7. Liposomal verkapseltes Taxol nach Anspruch 1–5, dadurch gekennzeichnet, daß es als geladene Lipidkomponente Phosphatidylserin enthält.
  8. Liposomal verkapseltes Taxol nach Anspruch 1–5, dadurch gekennzeichnet, daß es als geladene Lipidkomponente Phosphatidylglycerol enthält.
  9. Liposomal verkapseltes Taxol nach Anspruch 1–5, dadurch gekennzeichnet, daß es als gesättigte Lipidkomponenten Dipalmitoylphosphatidylcholin enthält.
  10. Liposomal verkapseltes Taxol nach Anspruch 1–5, dadurch gekennzeichnet, daß es als gesättigte Lipidkomponenten Dimyrestoylphosphatidylcholin enthält.
  11. Liposomal verkapseltes Taxol nach Anspruch 1–5 dadurch gekennzeichnet, daß es als geladene Lipidkomponente Etherlipide enthält.
  12. Liposomal verkapseltes Taxol nach Anspruch 1–11 dadurch gekennzeichnet, daß in bzw. an der Membran der Vesikel (über chemische Kopplung) Polyethylenglycol (MG 2000–10 000) enthält.
  13. Pharmazeutische Zubereitung, enthaltend eine wirksame Menge verkapseltes Taxol nach Anspruch 1–12 und pharmazeutisch übliche Träger- und Zusatzstoffe.
  14. Verfahren zur Herstellung von liposomal verkapseltem Taxol nach Anspruch 1–12, dadurch gekennzeichnet, daß ein Gemisch von membranbildenden Amphiphilen, in denen Taxol gelöst wurde, und eine wäßrige Phase, ggf. nach Herstellung eines dünnen, trockenen Lipidfilms, nachfolgender Entfernung der Lösungsmittel durch Evaporation und Dispergieren in Wasser, ein- oder mehrmals, höchstens fünfzigmal, einer Hochdruckhomogenisation mit Drucken von 50 bis 1600 bar (5–160 Mpa) unterzogen wird und ggf. nachfolgend eine Gefrier/Tau-Behandlung, ggf. eine Überführung in eine freifließende Dispersion und anschließend ggf. eine Extrusion durch Filter mit einer Porenweite von 0,1 bis 1  $\mu\text{m}$  erfolgt.
  15. Verfahren zur Herstellung von liposomal verkapseltem Taxol nach Anspruch 1–12 durch Aerosolbildung, dadurch gekennzeichnet, daß eine vorgefertigte Liposomen-Mischung in fester bzw. flüssiger Form mit Taxol vereinigt und nachfolgend in speziellen Aerosolbildenden Vorrichtungen behandelt wird.
  16. Verfahren zur Herstellung von liposomal verkapseltem Taxol nach Anspruch 1–12, dadurch gekennzeichnet, daß Taxol und die Verkapselungsmittel in einem druckverflüssigten Treibgas gelöst vorliegen und nach Verdampfen des Treibgases durch spontane Vesikelbildung auf dem Lungenepithel in liposomal verkapseltes Taxol überführt werden.
  17. Verwendung von liposomal verkapseltem Taxol nach Anspruch 1–12 als Cytostatikum.
  18. Verwendung von liposomal verkapseltem Taxol nach Anspruch 17 in Kombination mit anderen Wirkstoffen.
  19. Verwendung von liposomal verkapseltem Taxol nach Anspruch 17 in Kombination mit liposomal verkapseltem Carboplatin.
  20. Verwendung von liposomal verkapseltem Taxol nach Anspruch 17 in Kombination mit Carboplatin.
  21. Verwendung von liposomal verkapseltem Taxol nach Anspruch 17 gegen Hirntumoren.
  22. Verwendung von liposomal verkapseltem Taxol nach Anspruch 17 gegen maligne Melanome.
  23. Verwendung von liposomal verkapseltem Taxol nach Anspruch 17 gegen Lebermetastasen.
  24. Verwendung von liposomal verkapseltem Taxol nach Anspruch 17 gegen Lungenmetastasen.
  25. Verwendung von liposomal verkapseltem Taxol nach Anspruch 17 gegen Mammakarzinome.

# DE 44 30 593 A1

26. Verwendung von liposomal verkapseltem Taxol nach Anspruch 17 gegen Urogenitalkarzinome.  
27. Verwendung von liposomal verkapseltem Taxol in Kombination mit liposomal verkapseltem Carboplatin in Aerosolform nach Anspruch 19 gegen Lungenmetastasen.

Hierzu 2 Seite(n) Zeichnungen

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Abb. 1

**Topic:** Taxol in SUV  
Mammacarcinom MaTu

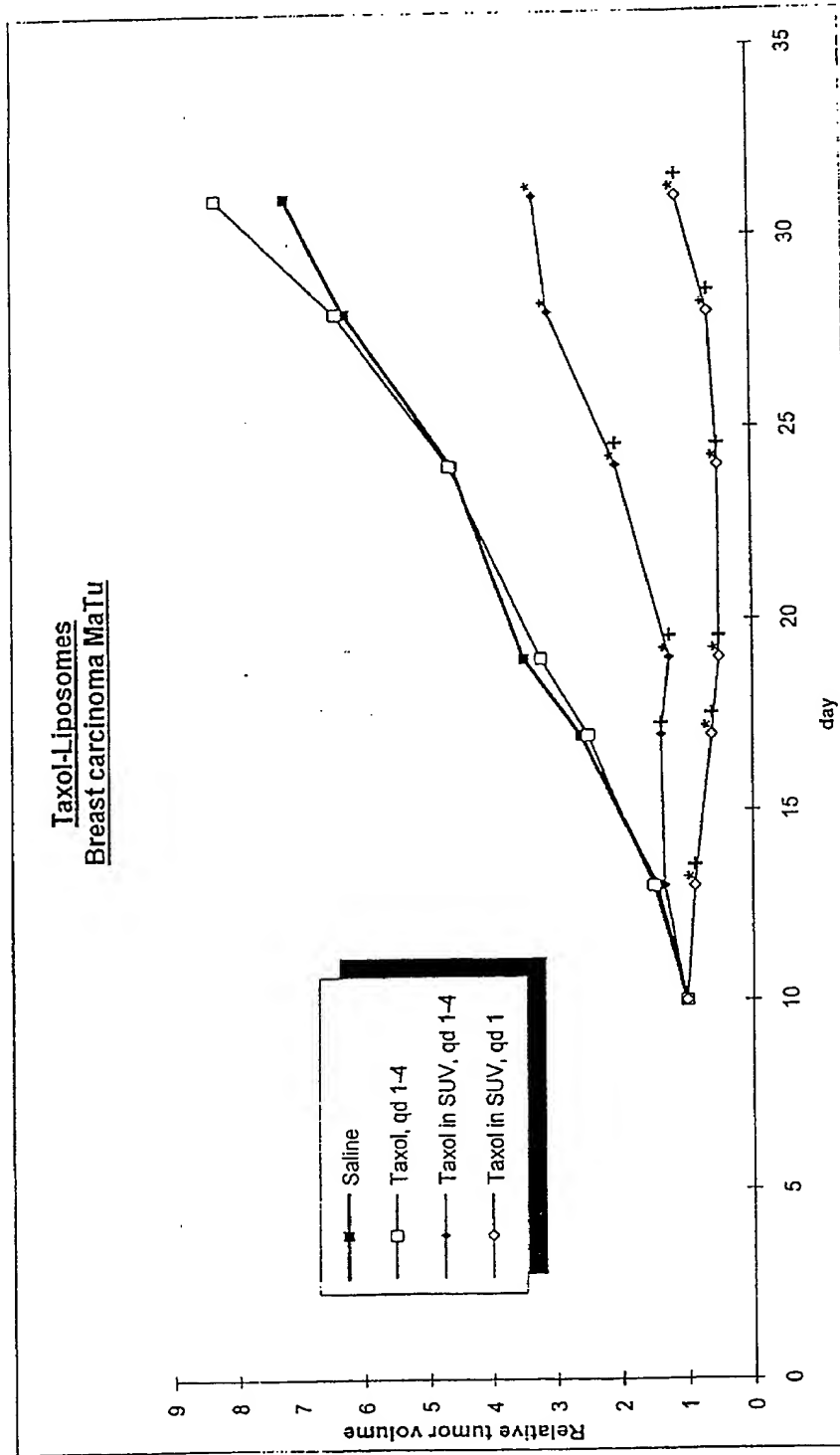
**Animals:** Nr.:nu/nu weiblich  
**Tumor:** MaTu s.c.  
**Therapy:** i.p.

Group	Nu.mice	Substance	Treatment (d)	Dose (mg/kg/inj.)	toxic deaths(d)	BWC (%) d10-13	Tumor growth s. Abb.
A	8	saline	10-13			1	
B	8	Taxol	10-13	12,5	1 (16)	-1	
C	8	Taxol in SUV J918	10-13	12,5	2 (21,32)	1	
D	8	Taxol in SUV	10	50		2	

**Comment:** Liposomen besser als freies Taxol  
 Einmalige Behandlung = Therapie an 4 aufeinander folgenden Tagen (Depoteffekt?)  
 gleiches Körpergewicht in allen Gruppen



Abb. 2



Treatment: i.p.,  
qd 1-4, 12,5 mg/kg/d  
qd1, 50 mg/kg

\* significant to controls  
+ significant to free Taxol



19 BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENT- UND  
MARKENAMT

12 Patentschrift  
10 DE 44 30 593 C 2

51 Int. Cl.<sup>6</sup>:  
A 61 K 31/335

21 Aktenzeichen: P 44 30 593.1-41  
22 Anmeldetag: 20. 8. 94  
43 Offenlegungstag: 22. 2. 96  
45 Veröffentlichungstag  
der Patenterteilung: 14. 1. 99

DE 44 30 593 C 2

Innerhalb von 3 Monaten nach Veröffentlichung der Erteilung kann Einspruch erhoben werden

73 Patentinhaber:

Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin,  
13125 Berlin, DE

62 Teil in: P 44 47 770.8

72 Erfinder:

Reszka, Regine, Dr., 16341 Schwanebeck, DE;  
Brandl, Martin, Dr., 79102 Freiburg, DE; Fichtner,  
Iduna, Dr., 13125 Berlin, DE; Warnke, Gernot, Dr.,  
79102 Freiburg, DE

56 Für die Beurteilung der Patentfähigkeit in Betracht  
gezogene Druckschriften:

WO 93 18 751

Pharmaceut. Res. 11(6), 889-896(1994);  
Cancer Res. 53, 5877-5881 (1993);

54 Verfahren zur Herstellung von Liposomal verkapseltem Taxol

57 Verfahren zur Herstellung einer pharmazeutischen Zubereitung, enthaltend liposomal verkapseltes Taxol mit hohem Taxolanteil, dadurch gekennzeichnet, daß zur Verkapselung des Taxols ein Gemisch von membranbildenden Amphiphilen, in denen Taxol gelöst wurde, und eine wäßrige Phase ein- bis fünfzigmal einer Hochdruckhomogenisation mit Drucken von 50 bis 1600 bar (5-160 Mpa) unterzogen wird.

Taxol in SUV Mammakarzinom MaTu							
Tiere:		Normale weiblich					
Tumor:		MaTu		s.c.			
Therapie:		Lp.					
Gruppe	Zahl d. Mäuse	Substanz	Behandlung (d)	Dosis (mg/kg/tg)	muskel Tode (n)	BWZ (%) d10-13	Tumor Wachstum s. Abb.
A	8	Saline	10-13			1	
B	8	Taxol	10-13	12,5	1 (16)	-1	
C	8	Taxol in SUV J918	10-13	12,5	2 (21,32)	1	
D	8	Taxol in SUV	10	50		2	

Anmerkung: Liposomen besser als freies Taxol  
Einmalige Behandlung = Therapie an 4 aufeinander folgenden Tagen (Depoteffekt)  
gleiches Körpergewicht in allen Gruppen

DE 44 30 593 C 2

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von liposomal verkapselten Taxol, Anwendungsgebiete der Erfindung sind die Medizin und die pharmazeutische Industrie.

Taxol ist ein in der Rinde verschiedener Eibenarten (Taxaceen) vorkommender Naturstoff der aus diesen Rinden [J. Amer. Chem. Soc., 93 : 2325 (1971)] bzw. neuerdings auch durch chemische Synthese [J. Amer. Chem. Soc., 1110 : 5917-5919 (1988)] gewonnen werden kann. Taxol verfügt im Vergleich zu bisher bekannten Zytostatika über einen völlig neuartigen Wirkmechanismus [Ann. NY. Acad. Sci. 466 : 733-744 (1986); Sartorelli, A (ed.): Molecular Actions and Targets for Cancer Chemotherapeutic Agents. Academic Press, New York, 1981, pp. 483-507.] Die Substanz fördert die Aggregation der Mikrotubuli aus Tubulindimeren und stabilisiert die Mikrotubuli durch Hemmung ihrer Depolymerisation. Weiterhin kommt es zu einer abnormen Anordnung und Bündelung von Mikrotubuli während des gesamten Zellzyklus, was zur Bildung multipler mikrotubulärer Teilungssterne während der Mitose und damit zur Hemmung der normalen dynamischen Reorganisation des mikrotubulären Netzwerkes führt. Da dadurch die vitale Zellfunktion in der Interphase und während der Mitose entscheidend beeinflusst wird, zeigt Taxol eine deutliche antineoplastische Aktivität gegen verschiedene Tumoren, u. a. gegen implantierte B16-Melanome, P388-Leukämie und gegen humane Mammatumoren.

Die Anwendbarkeit von Taxol ist durch seine geringe Wasserlöslichkeit stark eingeschränkt. Lösungsvermittler wie Cremophor (polyethoxyliertes Castoröl) und Alkohol verbessern die Löslichkeit, führen jedoch bei der Anwendung zu erheblichen Nebenwirkungen, z. B. zu anaphylaktoiden Reaktionen. Die Verdünnung solcher Lösungen mit physiologischer Kochsalzlösung zur Applikation hat den Nachteil, daß Taxol in physiologischer Kochsalzlösung keine ausreichende Stabilität (maximal 24 Stunden) besitzt. Eine dosislimitierende Nebenwirkung ist die Myelosuppression in erster Linie die Neutropenie [Semin. Oncol. 19 : 646-662 (1992)]. Liposomen bieten aufgrund ihres amphiphilen Charakters die Möglichkeit sowohl wasser- als auch lipidlösliche Substanzen einzuschließen bzw. zu inkorporieren.

Taxol als eine fast wasserunlösliche Substanz läßt sich mit hoher Effizienz in der Lipidphase von Liposomen geeigneter Zusammensetzung lösen, so daß die durch Cremophor EL beim Menschen beobachteten Toxizitäten einschließlich einer vermehrten Chylomikronenbildung nicht mehr auftreten sollte. Die therapeutische Effektivität von freiem, liposomal verkapseltem und nanopartikulärem Taxol werden an zwei Leukämien, der P388 und der L1210, in vitro verglichen. Während die Wachstumshemmung der P388-Zellen für alle 3 Arzneimittelformen gleich war, zeigte die L1210 eine größere Sensitivität gegenüber der nanopartikulären Form. Bei Testung aller 3 Zubereitungen an der P388 in vivo (12,5 mg/kg/4 Tage) waren die freie und liposomale Form in ihrer therapeutischen Effektivität vergleichbar, während nanopartikuläres Taxol akute Toxizitäten hervorrief [J. Microencapsul. 7 (2): 191-7 (1990)]. In einer weiteren Studie wurde Taxol in freier und liposomaler Form hinsichtlich der Antitumoraktivität an zwei humanen Glioblastomen im Nude-Modell getestet (12,5 mg/kg/4 Tage). Beide Formen führten zu einer signifikanten Verringerung des Tumorstadiums [In-Vivo 6 (1): 23-7 (1992)]. Sharma et al. [Cancer Res. 53: 5877-81 (1993)] und Straubinger et al. [J. Natl. Cancer Inst. Monographs 15: 69-78 (1993)] berichten von einem signifikanten Antitumoreffekt von liposomalem Taxol (10-45 mg/kg) am murinen Taxol-resistenten Colon-26-Modell. In WO 93/18751 wird die Verkapselung von Taxol in Liposomen und die Verwendung der erhaltenen Produkte zur Behandlung von Krebserkrankungen beschrieben. Bevorzugt wird eine Kombination dieser Behandlung mit Hyperthermie. Die hergestellten Taxol-Liposomen zeigen eine verbesserte Stabilität.

Bisher wurde ein Patent (WO 93/18751) angemeldet, in dem eine Vielzahl von Taxol-Liposomen-Kombinationen beansprucht wird, von denen insbesondere Vesikel mit positiver Ladung auf der Basis von Cardiolipin, Phosphatidylcholin und Cholesterol hergestellt und untersucht wurden.

Das auf diese Weise verkapselte Taxol mußte jedoch in den Tierversuchen an vier aufeinanderfolgenden Tagen appliziert werden, da eine einmalige Gabe offensichtlich nicht zum gewünschten Antitumoreffekt führte.

Die Erfindung hat das Ziel, liposomal verkapseltes Taxol mit hohem Taxolanteil und höherer Stabilität, damit erhöhter therapeutischer Wirksamkeit, zur Verfügung zu stellen. Die Aufgabe besteht darin, spezifische Formen der Verkapselung von Taxol zu entwickeln und diese, ggf. in Kombination mit anderen freien bzw. liposomal verkapselten Substanzen, zur Behandlung unterschiedlicher Tumorarten und Lokalisationen einzusetzen. Im Vordergrund steht hierbei neben der möglichst einmaligen Applikation des liposomalen Taxols auch die Verhinderung des dosislimitierenden neutropenischen Effektes, des unverkapselten Taxols z. B. durch Kombination mit liposomalem Carboplatin.

Die Aufgabe wird gemäß Anspruch 1 gelöst, die Unteransprüche sind Vorzugsvarianten. Die Verkapselung wird erfindungsgemäß mittels Hochdruckhomogenisierung durchgeführt.

Die Experimente umfassen Arbeiten zur Präparation und Charakterisierung verschiedener taxolhaltiger Liposomentypen unterschiedlicher Größe und Zusammensetzung.

Für die tierexperimentelle Prüfung wurden Liposomen nach Beispiel 1 eingesetzt. Es konnte u. a. an einem menschlichen Mamma-Karzinom (MaTu) gezeigt werden, daß diese Liposomenpräparation im Vergleich zum freien Taxol (4 Tage Therapie, je Tag 12,5 mg/kg) bereits nach einmaliger Applikation von 50 mg/kg eine verbesserte therapeutische Wirksamkeit bei geringerer Hämatotoxizität aufwies (Abb. 1 + 2).

Als Verkapselungsmittel werden verwendet

- a) ein natürliches, halbsynthetisches oder vollsynthetisches Amphiphil, wie ein Lipid, ein Tensid oder einen Emulgator,
- b) eine geladene Lipidkomponente und/oder eine gesättigte Lipidkomponente, eine Etherlipidkomponente,
- c) ein Polymer
- d) eine Trägerflüssigkeit und ggf. zusätzliche Hilfsstoffe, wie z. B. Nanopartikel enthält.

Das Amphiphil hat bevorzugt die in Anspruch 8 angegebene Formel I. Als geladene Lipidkomponente werden bevorzugt eingesetzt: das Anion des Dicethylphosphats, der Palmitinsäure, der Stearinsäure, das Anion eines Phospholipids, wie Phosphatidylserin oder Phosphatidsäure oder das Anion eines Sphingolipids wie Sulfatid. In einer besonders günstigen

gen Ausführungsform der Erfindung wird als geladene Lipidkomponente Phosphatidylglycerol eingesetzt.

Die Erfindung kann gleichermaßen mit neutralen Lipidkomponenten wie Phosphatidylcholin oder gesättigten Lipidkomponenten wie Dipalmitoylphosphatidylcholin realisiert werden. Als Polymer dient z. B. Polyethylenglycol vom Molekulargewicht 2000–10000. Als Trägerflüssigkeit wird im allgemeinen physiologische Kochsalzlösung eingesetzt. Gegenstand der Erfindung ist auch eine pharmazeutische Zubereitung, die das erfindungsgemäße liposomal verkapselte Taxol und pharmazeutisch übliche Träger- und Zusatzstoffe enthält. Eine praktisch vorteilhaft einsetzbare Mischung enthält 0,98 mg Taxol in 50 mg Phosphatidylcholin (98% der eingesetzten Taxolmenge).

Die liposomale Verkapselung erfolgt durch Hochdruckhomogenisierung. Es wird eine vorgefertigte Liposomen-Mischung in fester bzw. flüssiger Form mit Taxol vereinigt, nachfolgend mehrfach (bevorzugt 2-fach) bei 5–160 MPa homogenisiert und ggf. nachfolgend lyophilisiert.

Das Herstellungsverfahren zur Erzeugung einer Taxol-haltigen liposomalen Zubereitung mittels Hochdruckhomogenisation, sowie ggf. Freisetzung von Liposomen aus einer solchen Zubereitung umfaßt folgende Schritte:

1) Fakultativ Herstellung eines Lipidfilms und Überführung desselben in eine Vormischung bestehend aus Membranbildnern und wässrigem Medium:

Herstellung eines dünnen, trockenen Lipidfilms durch Auflösen des Taxols zusammen mit den Membranbildnern in organischen Lösungsmitteln. Nachfolgend vollständige Entfernung der Lösungsmittel durch Evaporation ggf. durch Sprühtrocknung. Dispergieren des Lipidfilms nach Zugabe von wässrigem Medium, z. B. durch Schütteln, Rühren, Kneten o. ä. ggf. unter erhöhter Temperatur (ca. 10°C oberhalb der Phasenübergangstemperatur der Phospholipide).

2) Hochdruckhomogenisation:

Entweder die aus 1) erhaltene Vormischung oder alternativ ein Gemisch aus Lipid(en), Wasser und Taxol (ggf. grob dispergiert durch Rühren z. B. mittels eines Magnetrührers o. ä.) wird ein- oder mehrmals (jedoch nicht mehr als fünfzigmal) der Hochdruckhomogenisation (z. B. mittels APV Gaulin Micron Lab) unter Drucken zwischen 5 und 160 MPa (50 bis 1600 bar) unterzogen. Edukt, Homogenisator und Produkt werden ggf. temperiert.

3) Fakultativ Gefrier/Tau-Behandlung:

Durch ein- bis mehrmaliges Einfrieren und nachfolgendes Wiederauftauen der Zubereitung während, d. h. zwischen einzelnen Zyklen der Hochdruckhomogenisation oder an deren Ende wird eine homogenere Durchmischung des Ansatzes erreicht und evtl. die vorgebildeten Liposomen vorübergehend destabilisiert, so daß Liposomen mit noch mehr inkorporierten Taxol gebildet werden.

4) Fakultativ Gefriertrocknen und Redispergieren:

Durch ein- bis mehrmaliges Gefriertrocknen und nachfolgendes Redispergieren der Zubereitungen bevorzugt während, d. h. zwischen einzelnen Zyklen der Hochdruckhomogenisation oder an deren Ende wird eine homogenere Durchmischung des Ansatzes erreicht und die vorgebildeten Liposomen vorübergehend destabilisiert, so daß Liposomen mit noch mehr inkorporiertem Taxol gebildet werden.

5) Fakultativ Überführung der Zubereitung in eine freifließende Liposomendispersion:

Durch schrittweise Zugabe von wässrigem Medium in Volumenanteilen von 1 bis 30% des Volumens der Zubereitung und mechanisches Mischen z. B. durch manuelles Schütteln oder mittels eines Vortex Mischers wird das dreidimensionale Gelgerüst zerlegt und die vorgebildeten Liposomen freigesetzt.

6) Fakultativ Filtration der Liposomendispersion:

Falls die Liposomengröße nach oben hin begrenzt werden soll bzw. eine sterile Zubereitung erhalten werden soll, kann die Liposomendispersion durch Filter mit einer Porenweite von 0,1 µm bis 1 µm filtriert werden.

Die so hergestellte Zubereitung, die Liposomen in dichter Packung enthält (Liposomengel), eignet sich als Wirkstoff-depot, das den Wirkstoff langsam freisetzt und zwar entweder in gelöster Form oder in Form einzelner Wirkstoff-enthaltender Liposomen. Diese Zubereitung kann durch Injektion (z. B. i. m., i. p.) oder Implantation angewendet werden. Aber auch ein Einbringen in Körperhöhlen oder ein Aufbringen auf Schleimhäute, auf die Hornhaut des Auges (Kornea) oder Hautpartien ist möglich. Somit dient die Zubereitung als Träger des Wirkstoffs sowie ggf. zu dessen modifizierter Freigabe.

Die so hergestellte Zubereitung, die Liposomen in freifließender Form enthält, eignet sich als Träger des Wirkstoffs. Diese Zubereitung kann durch Injektion (z. B. i. v., i. m.) oder ebenfalls durch Einbringen in Körperhöhlen oder Aufbringen auf Schleimhäute, auf die Hornhaut des Auges (Kornea) oder Hautpartien angewendet werden. Die erfindungsgemäß verkapselten Liposomen führen zu einer Verteilung des liposomalen Wirkstoffs im Körper, die selektiv eine hohe und lange andauernde Wirkstoffkonzentration am Wirkort bewirkt und damit zu einer Verbesserung der Wirkung oder zu einer Verbesserung des Verhältnisses von Wirkung zu Nebenwirkung.

Die vorgebildeten Taxol-Liposomen können nach Aerosolisierung vernebelt werden.

Dieser Weg ist vor allem dann vorzuziehen, wenn ein direkter Einsatz gegen Lungenmetastasen beabsichtigt ist.

Das liposomal verkapselte Taxol ist als Zytostatikum verwendbar. Diese Verwendung kann allein oder in Kombination mit anderen Wirkstoffen wie Carboplatin oder liposomal verkapseltem Carboplatin erfolgen. Bevorzugt ist der Einsatz gegen Hirntumoren, maligne Melanome, Lebermetastasen, Lungenmetastasen, Mammakarzinome und gegen Urogenitalkarzinome.

Bei der Behandlung u. a. eines menschlichen Mamma-Karzinomen auf der Nudemaus wurde nach einmaliger Gabe von 50 mg/kg liposomal verkapseltem Taxols, im Vergleich zur behandelten Taxolgruppe (4 × 12,5 mg/kg) eine signifikante Tumolvolumenhemmung erreicht.

Die Erfindung soll nachfolgend durch Ausführungsbeispiele näher erläutert werden.

#### Beispiel 1

Ein Lipidfilm, bestehend aus 1500 mg Eiphsphatidylcholin und 30 mg Taxol wird in 30 ml steriler, Calcium-freier

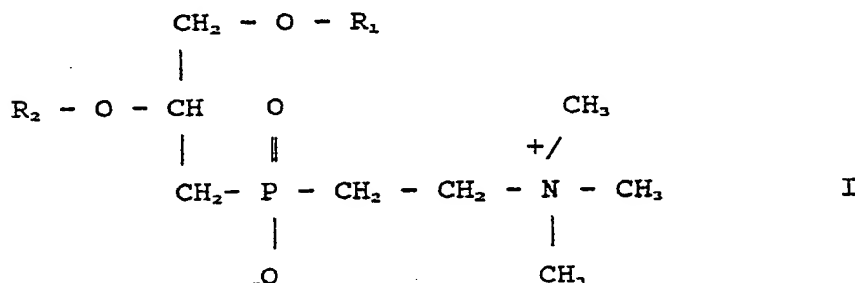
Phosphat-gepufferter (pH 7,2-7,4) Kochsalzlösung dispergiert. Die entstandene Dispersion multischichtiger Liposomen wird im Hochdruckhomogenisator (Gaulin Mikrolab 40) bei 700 bar behandelt. Die entstandene Liposomendispersion (SUV) ist bei 4 Grad Celsius kurzzeitig lagerfähig und eignet sich zur parenteralen (i. v.) Applikation. Zur längeren Lagerung eignet sich die Gelbildung bzw. die Lyophilisierung.

## Beispiel 2

Liposomen, hergestellt wie im Beispiel 1 werden mit einem geeigneten Vernebler aerosolisiert (z. B. Aero-Tech II) und somit der inhalativen Applikation zugänglich gemacht.

## Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellung einer pharmazeutischen Zubereitung, enthaltend liposomal verkapseltes Taxol mit hohem Taxolanteil, **dadurch gekennzeichnet**, daß zur Verkapselung des Taxols ein Gemisch von membranbildenden Amphiphilen, in denen Taxol gelöst wurde, und eine wäßrige Phase ein- bis fünfzigmal einer Hochdruckhomogenisation mit Drucken von 50 bis 1600 bar (5-160 Mpa) unterzogen wird.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß vor der Hochdruckhomogenisation ein dünner, trockener Lipidfilm unter Entfernung der Lösungsmittel durch Evaporation oder durch Sprühtrocknung hergestellt wird und der Lipidfilm in Wasser dispergiert wird.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß zwischen oder nach der Hochdruckhomogenisation eine Gefrier/Tau-Behandlung oder eine Gefriertrocknung/Redispersions-Behandlung erfolgt.
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß eine Überführung in eine freifließende Dispersion erfolgt.
5. Verfahren nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Dispersion durch Filter mit einer Porenweite von 0,1 bis 1 µm filtriert wird.
6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß als Verkapselungsmittel
  - a) ein natürliches, halbsynthetisches oder vollsynthetisches Amphiphil
  - b) eine geladene Lipidkomponente und/oder eine gesättigte Lipidkomponente und/oder eine Etherlipidkomponente,
  - c) ein Polymer
  - d) eine Trägerflüssigkeit eingesetzt werden.
7. Verfahren nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß das Amphiphil ein Lipid, ein Tensid oder ein Emulgator ist.
8. Verfahren nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß ein natürliches, halbsynthetisches oder vollsynthetisches Amphiphil der allgemeinen Formel I,



worin R<sub>1</sub> und R<sub>2</sub> C<sub>10</sub>-C<sub>20</sub>-Alkanoyl, -Alkenoyl, -Alkyl, -Alkenyl bedeuten, eingesetzt wird.

9. Verfahren nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß als geladene Lipidkomponente das Anion des Dicetylphosphats, der Palmitinsäure, der Stearinsäure, das Anion eines Phospholipids, das Anion eines Sphingolipids, eingesetzt wird oder daß ein chemisch modifiziertes Phosphatidylethanolamin, über das Proteine angekoppelt werden können, oder Etherlipide, eingesetzt werden.

10. Verfahren nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß, Phosphatidylserin, Phosphatidsäure, Phosphatidylglycerol oder Sulfatid eingesetzt wird.

11. Verfahren nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß als neutrale Lipidkomponente Phosphatidylcholin eingesetzt wird.

12. Verfahren nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß als gesättigte Lipidkomponenten Dipalmitoylphosphatidylcholin oder Dimyristoylphosphatidylcholin eingesetzt wird.

13. Verfahren nach einem der Ansprüche 6 bis 12, dadurch gekennzeichnet, daß Nanopartikel als zusätzliche Hilfstoffe eingesetzt werden.

14. Verfahren nach einem der Ansprüche 6 bis 12, dadurch gekennzeichnet, daß in oder an der Membran der Vesikel als Polymer Polyethylenglycol (MG 2000-10000) enthalten ist.

Hierzu 2 Seite(n) Zeichnungen

Taxol in SUV  
Mammakarzinom MaTu

Tiere: Ncr:nu/nu weiblich

Tumor: MaTu s.c.

Therapie: i.p.

Gruppe	Zahl d. Mäuse	Substanz	Behandlung (d)	Dosis (mg/kg/inj.)	toxisch Tode (d)	BWC (%) d10-13	Tumor Wachstum
A	8	Saline	10-13			1	s. Abb.
B	8	Taxol	10-13	12,5	1 (16)	-1	
C	8	Taxol in SUV J918	10-13	12,5	2 (21,32)	1	
D	8	Taxol in SUV	10	50		2	

Anmerkung: Liposomen besser als freies Taxol  
 Einmalige Behandlung = Therapie an 4 aufeinander folgenden Tagen (Depoteffekt)  
 gleiches Körpergewicht in allen Gruppen

Abb. 1

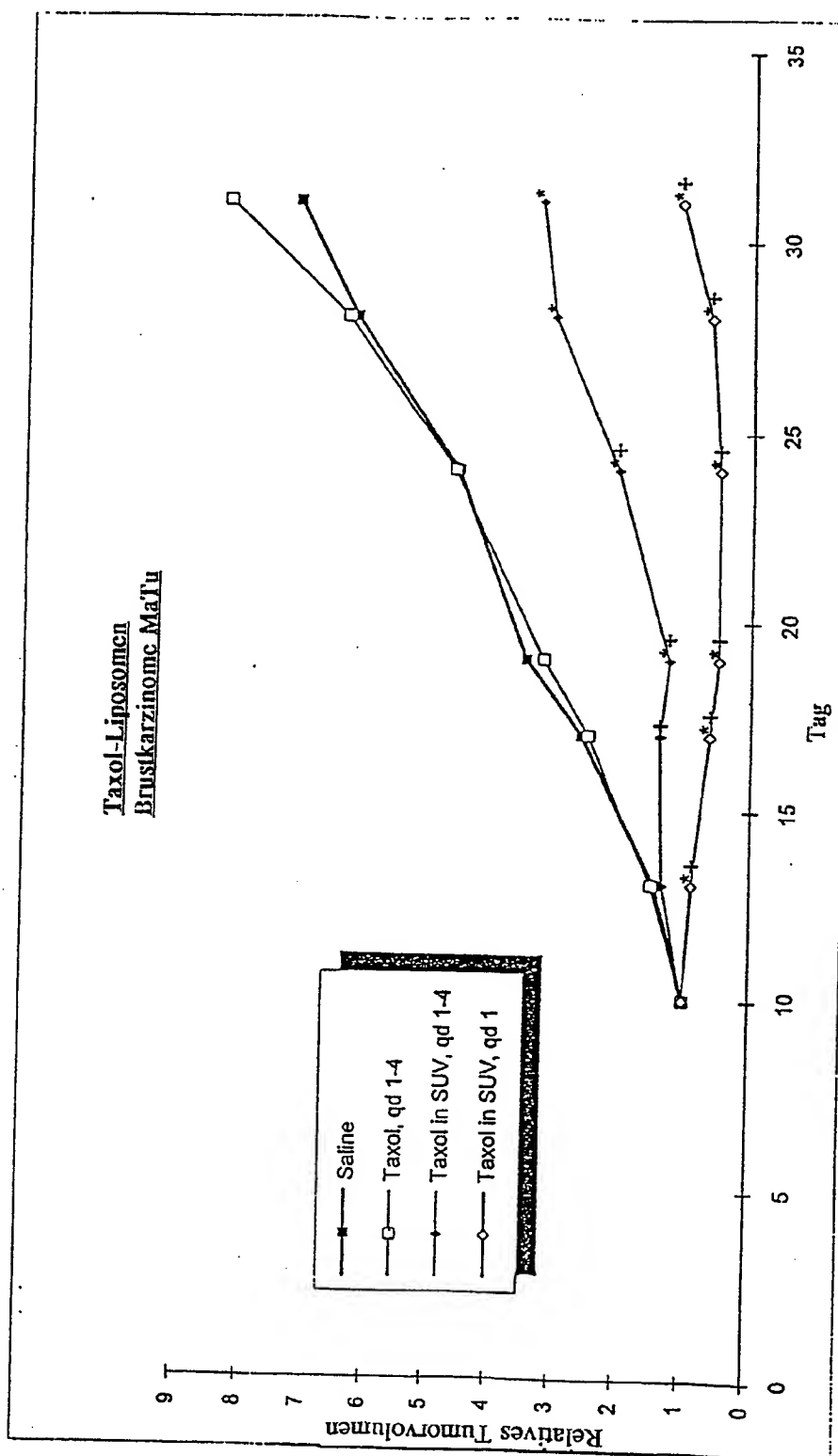


Abb. 2

\* signifikant zu Kontrollen  
+ signifikant zu freiem Taxol

Behandlung: i.p.,  
qd 1-4, 12,5 mg/kg/d  
qd1, 50 mg/kg